

Zur Analytik der Convallaria-Inhaltsstoffe

Ilse-Marie Diesener

Zur Analytik der
Convallaria-Inhaltsstoffe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Ilse-Marie Diesener
aus
Wernigerode/Harz

Mai 1959



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: ~~29. Sep. 1958~~ 29. Juli 1958

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. Einleitung	1
II. Allgemeiner Teil	3
A. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe der Convallaria majalis	3
B. Eigene Versuche zur Isolierung der Convallaria- Herzglykoside	7
a) Papierchromatographische Voruntersuchung der Gesamtauszüge	7
b) Papierchromatographische Voruntersuchung des Essigester-Äthanol-Auszuges	8
c) Selektive Abtrennung der Begleitstoffe und Isolierung der einzelnen Cardenolide	9
1. Polyamidchromatographie	9
2. Gegenstromverteilung	14
3. Ergebnisse und Diskussion der Cardenolid- Trennung	17
C. Versuche zur Isolierung der Begleitstoffe	20
a) Flavone	20
b) Organische Säuren	25
c) Substanzen R und V	26
d) Zusammenfassung der Ergebnisse	28
D. Schlußfolgerungen	30
III. Experimenteller Teil	37

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die jüngsten Veröffentlichungen von R. TSCHESCHE¹⁾²⁾³⁾, H. ERBRING und Mitarbeitern⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾ und R. LAUFKE⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ zeigen, daß die Convallaria-Forschung, der seit Jahren zahlreiche Untersuchungen gewidmet wurden, noch keineswegs abgeschlossen ist. Als bedeutendstes Problem gilt auch heute noch die Reindarstellung der einzelnen Cardenolide, die schwer zugänglich und zum Teil in ihrer chemischen Konstitution noch ungeklärt sind.

Nicht minder wichtig dürfte aber für den Pharmakognosten und den Pharmakologen die Kenntnis der in der Convallaria-Droge vorhandenen Begleitstoffe sein, da man in letzter Zeit fand¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾, daß in vielen Fällen Gesamtauszüge von Drogen gegenüber Reinstoffen bessere therapeutische Wirkungen zeigen.

-
- 1) TSCHESCHE, R. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 87, 1108 (1954)
 - 2) SEEHOFER, F.: Dissertation, Hamburg 1954
 - 3) TSCHESCHE, R., WULFF, H. J., DÖLBERG, U. u. SNATZKE, G.: Naturwissenschaften 46, 109 (1959)
 - 4) ERBRING, H. u. PATT, P.: Arzneimittel-Forsch. 8, 554 (1958)
 - 5) ERBRING, H., PATT, P. u. FREY, N.: Arzneimittel-Forsch. 8, 289 (1958)
 - 6) ERBRING, H., KOCH, Fr. E., LORENZ, D., MADAUS, R., ORZECZOWSKI, G. u. PATT, P.: Die Medizinische 35, 1326 (1958)
 - 7) LORENZ, D. u. STOECKERT, L.: Arzneimittel-Forsch. 8, 557 (1958)
 - 8) EGGERS, P. u. ZYLMANN, E.: Die Medizinische 35, 1331 (1958)
 - 9) BOLTZE, K. H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 412 (1957)
 - 10) LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 582 (1957)
 - 11) LAUFKE, R.: Planta med. 6, 237 (1958)
 - 12) LAUFKE, R.: Pharmaz. Ztg. 103, 599 (1958)
 - 13) HAACK, E., KAISER, F., GUBE, J. u. SPINGLER, H.: Arzneimittel-Forsch. 6, 176 (1956)
 - 14) ACHELIS, J. D. u. KRONEBERG, G.: Arzneimittel-Forsch. 6, 182 (1956)
 - 15) KROETZ, Chr. u. FOERSTER, Kl.: Arzneimittel-Forsch. 6, 189 (1956)

Eine Reihe von Problemen - teils analytischer, teils pharmakologischer Art - sind somit noch ungelöst. Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, auf zwei dieser Probleme näher einzugehen:

1. auf die vereinfachte Isolierung von Convallatoxin und seinen Nebenglykosiden und
2. auf die Isolierung und Charakterisierung bzw. Identifizierung der in Convallaria-Auszügen vorhandenen Begleitstoffe, die entweder als Lösungsvermittler oder als Stoffe im Sinne einer additiven pharmakologischen Wirkung in Frage kommen können.

II. Allgemeiner Teil

A. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe von Convallaria

majalis

Die ältesten Arbeiten in der Convallaria-Forschung stellen die Untersuchungen von G. F. WALZ¹⁶⁾¹⁷⁾, C. MARME¹⁸⁾, J. LINDNER¹⁹⁾ und E. HIRSCHBERG²⁰⁾ dar, die sich um die Isolierung und die Strukturaufklärung des saponinartigen Convallarins bzw. des Convallamarins bemühten und die V. VOSS und G. VOGT²¹⁾ fortsetzten. St. MARTIN²²⁾ führt ein Alkaloid Majalin an, das R. LAUFKE²³⁾ als Cholin identifiziert. W. KARRER²⁴⁾ gelingt die Isolierung des Convallatoxins, des wirksamsten Herzgiftes aus den Maiglöckchenblüten. Dieses bezeichnen K. MOHR und T. REICHSTEIN²⁵⁾ auch als wichtigstes Cardenolid der Blätter. L. F. FIESER und R. P. JACOBSEN²⁶⁾ legen seine Konstitution fest. R. TSCHESCHE und F. SEEHOFER²⁷⁾ geben eine zusammenfassende

16) WALZ, G. F.: Jb. prakt. Chem. 7, 281 (1843)

17) WALZ, G. F.: Jb. prakt. Chem. 8, 78 (1843)

18) MARME, C.: Göttinger Nachr. 167 (1867)

19) LINDNER, J.: Mh. Chem. 36, 257 (1915)

20) HIRSCHBERG, E.: in KOBERT, R. "Neue Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen", Stuttgart 1917, Bd. II, S. 56

21) VOSS, V. u. VOGT, G.: Chem. Ber. 69, 2333 (1936)

22) MARTIN, St.: Bull. d. Théor. 69, 128 (1865); cit.: Schmidts Jahrbuch d. in- u. ausl. ges. Med. 128, 173 (1865)

23) LAUFKE, R.: Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 96, 452 (1957)

24) KARRER, W.: Helv. chim. Acta 12, 506 (1929)

25) MOHR, K. u. REICHSTEIN, T.: Pharmac. Acta Helvetiae 23, 369 (1948)

26) FIESER, F. L. u. JACOBSEN, R. P.: J. Amer. chem. Soc. 59, 2335 (1937)

27) TSCHESCHE, R. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 87, 1108 (1954)

Übersicht über neun bis heute bekannte, wenn auch zum Teil noch nicht völlig aufgeklärte Cardenolide des Krautes.

An Begleitstoffen nennt G. F. WALZ²⁸⁾ Asparagin, Apfel- und Zitronensäure. E. STRANSKY²⁹⁾, H. SCHINDLER³⁰⁾ und R. LAUFKE³¹⁾ berichten über Chelidonsäure (als Calcium-Salz); K. HERRMANN³²⁾ führt in einer Tabelle von Ch. CHARAUX³³⁾ Kaffeesäure an, bestätigt aber in eigenen Untersuchungen Charaux's Angabe nicht. R. COBET³⁴⁾ gibt auf Grund einer vergleichenden papierchromatographischen Arbeit Kämpferol- und Quercetinglykoside an. H. KYLIN³⁵⁾ findet freie reduzierende Zucker.

Die ersten Isolierungsversuche zur Gewinnung des kristallisierten Hauptcardenolides wurden von W. KARRER³⁶⁾ (aus Blüten) und von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE³⁷⁾ (aus dem Kraut) durchgeführt: Nach Entfernung der Ballaststoffe mit Bleiazetat wird "das" herzwirksame Glykosid an Kohle absorbiert, mit wasserfreien organischen Lösungsmitteln (Chloroform) eluiert und umkristallisiert. K. ZIPF und W. HEINRICH³⁸⁾ schlagen für die Convallatoxin-Gewinnung eine kontinuierliche Extraktion des Kohleadsorbats mit einem azeotropen Chloroform-Methanol-Gemisch vor.

Während diese Arbeiten nichts über die Cardenolid-Neben-

28) WALZ, G. F.: Jb. prakt. Chem. 6, 15 (1843)

29) STRANSKY, E.: Arch. Pharmaz. 258, 56 (1920)

30) SCHINDLER, H.: Süddtsch. Apotheker-Ztg. 89, 131 (1949)

31) LAUFKE, R.: Pharmaz. Ztg. 103, 599 (1958)

32) HERRMANN, K.: Pharmazie 11, 433 (1956)

33) CHARAUX, Ch.: J. Pharmac. Chim. 7, 292 (1910)

34) COBET, R.: Dissertation, München 1957

35) KYLIN, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 101, 77 (1918)

36) KARRER, W.: Helv. chim. Acta 12, 506 (1929)

37) DRP 490 648, HOFFMANN-LA ROCHE (1928)

38) DBP 864 312, ZIPF, K. u. HEINRICH, W., Fa. Goedicke & Co. Berlin

glykoside aussagen, finden K. MOHR und T. REICHSTEIN³⁹⁾, die das Kohle-Eluat an Aluminiumoxyd chromatographieren, Substanz B (Schmelzpunkt = 190° C) und Substanz C (Schmelzpunkt = 275° C).

H.-B. KOENIG⁴⁰⁾ entzieht dem durch Bleifällung gereinigten Krautextrakt mit Chloroform-Äthanol-Gemischen ein Glykosidkonzentrat, das er mit Hilfe der Gegenstromverteilung aufzutrennen versucht: Er gelangt nach Vor- und Hauptverteilung zu zwei kristallinen Stoffen (Reinheitsprüfung durch photometrische Messung der Extinktionen mit Baljet-Reagens bei 500 mμ im Beckmann-Photometer), zu:

1. Convallatoxin, das mit authentischem einen Mischschmelzpunkt von 232-248° C hat, und
2. zu Spuren einer Substanz mit dem Schmelzpunkt 266-269° C.

R. TSCHESCHE und F. SEEHOFER⁴¹⁾ entwickeln schließlich ein papierchromatographisches Verfahren für die Convallaria-Cardenolide. F. SEEHOFER⁴²⁾ versucht nochmals eine Cardenolid-Trennung durch Gegenstromverteilung. Das Ergebnis, das er mit Hilfe der erarbeiteten Papierchromatographie erhält, ist unbefriedigend, so daß er Auftrennungen durch Säulenchromatographie und präparative Papierchromatographie anstrebt. Durch Kombination der beiden Methoden kann er neun Cardenolide - zum Teil kristallin - gewinnen.

K.-H. BOLTZE und R. LAUFKE⁴³⁾ kommen nach einer Petrolätherfällung des Chloroform-Äthanol-Perforates zu einem nahezu weißen Convallatoxin vom Zersetzungspunkt 220-230° C.

Den Gedanken der präparativen Gewinnung einzelner Conval-

39) MOHR, K. u. REICHSTEIN, T.: Pharmac. Acta Helvetiae 23, 369 (1948)

40) KOENIG, H.-B.: Dissertation, Hamburg 1950

41) TSCHESCHE, R. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 87, 1108 (1954)

42) SEEHOFER, F.: Dissertation, Hamburg 1954

43) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 290/62, 412 (1957)

laria-Cardenolide durch Gegenstromverteilung greift R. LAUFKE⁴⁴⁾
⁴⁵⁾ wieder auf: Der Rückstand des Chloroform-Äthanol-Perfora-
tes⁴⁶⁾ wird mit Chloroform-iso-Amylalkohol-Wasser (1:1:1) nach
Entschäumerzusatz über 63 Stufen verteilt. Das Ergebnis ist
kristallines Convallatoxin vom Schmelzpunkt 225-230° C. Nach
präparativer Papierchromatographie der entsprechenden Vertei-
lungsfractionen gewinnt R. LAUFKE⁴⁴⁾⁴⁷⁾ noch fünf weitere Car-
denolide in nicht kristallisierenden, aber chromatographisch
einheitlichen Lösungen.

Eine allgemeine kulturgeschichtliche Betrachtung findet
sich bei W. v. BRUNN⁴⁸⁾, K. OESTBERG⁴⁹⁾, A. M. v. PROOIJEN⁵⁰⁾
und E. SCHULTES⁵¹⁾, der auch auf die verschiedenartige Anwen-
dung der Droge im Laufe der Jahrhunderte eingeht.

44) LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.
290/62, 582 (1957)

45) LAUFKE, R.: Pharmaz. Ztg. 103, 599 (1958)

46) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh.
pharmaz. Ges. 290/62, 412 (1957)

47) LAUFKE, R.: Planta med. 6, 237 (1958)

48) v. BRUNN, W.: "Das Maiglöckchen, eine alte vielgerühmte
Heilpflanze", Festschrift der Fa. Degen & Kuth, Düren, 1937

49) OESTBERG, K.: Farmac. Revy 20, 323 (1956); für die Über-
setzung des schwedischen Textes danken wir Frau Studienrätin
M. Walsemann, Lübeck.

50) v. PROOIJEN, A. M.: Pharmaz. Tijdschrift Belg. 33, 124 (1956)

51) SCHULTES, E.: Dissertation, Giessen 1953

B. Eigene Versuche zur Isolierung der Convallaria-Herzglykoside

Der Isolierungsarbeit geht im allgemeinen eine papierchromatographische Voruntersuchung des Gesamtpflanzenauszuges voraus. Sie liefert Anhaltspunkte, zu welchen Stoffgruppen die voneinander zu trennenden Inhaltsstoffe gehören.

a) Papierchromatographische Voruntersuchung der Gesamtauszüge

Ein durch Mazeration⁵²⁾⁵³⁾ und anschließende Extraktion im Soxhlet hergestellter und von Chlorophyll weitgehend befreiter Gesamtextrakt aus *Herba Convallariae majalis* wurde:

1. im Lösungsmittelsystem Pyridin-Essigester-Wasser (1:2:2) auf freie Zucker absteigend chromatographiert, das getrocknete Chromatogramm mit dem Anilin-Phthalsäure-Reagens nach S. M. PATRIDGE⁵⁴⁾ besprüht und bei 110° C getrocknet. Durch braune bzw. rote Flecke (R_F -Wert = 0,46 und 0,43) im Tageslicht - verstärkt im UV-Licht - wurden im Vergleich mit authentischen Zuckern Glucose und Arabinose nachgewiesen.
2. Im Lösungsmittelsystem Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) absteigend chromatographiert, zeigte das unbesprühte Chromatogramm im oberen Drittel unscharfe, blau fluoreszierende, in mittlerer Laufhöhe dunkle Flecken, und kurz nach dem Start fahlblaue Zonen.

Nach dem Besprühen entstanden:

- α) mit Keddes-Reagens⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾ auf Cardenolide im Tageslicht auf mittlerem R_F -Wert ungegliederte, violette Substanzflecke, die kräftige gelbe Zonen zum Teil überdeckten⁵⁸⁾.

52) LAUFKE, R.: *Planta med.* 5, 69 (1957)

53) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: *Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 290/62, 417 (1957)

54) PATRIDGE, S. M.: *Nature (London)* 164, 443 (1949)

55) KEDDE, D. L.: *Dissertation*, Leiden 1946

56) BUSH, J. E. u. TAYLOR, D. A. H.: *Biochem. J.* 52, 643 (1952)

57) ROSENTHALER, L.: *Pharmaz. Ztg.* 103, 320 (1958)

58) LAUFKE, R.: *Pharmaz. Ztg.* 103, 599 (1958)

- β) Mit basischem Bleiazetat (z.B. auf Flavone) bot sich im UV-Licht ein farbenprächtiges Bild: Im oberen Chromatogrammdrittel wechselten blaue, grüngelbe, rosaviolette mit gelben und rostroten Flecken. Leuchtende Gelbfärbung trat an den Stellen auf, die unbesprüht dunkel gewesen waren und an denen andererseits auch mit Keilids Reagens eine Reaktion eingetreten war.

Zusammenfassung: Eine papierchromatographische Untersuchung der Insektenszüge aus *Convolvularia majalis* ergab unscharfe Substanzflecken, die wir auf die Anwesenheit hydrophiler Stoffe (Sapone, Gerbstoffe, Zucker usw.⁵⁹⁾ zurückführten. Im Lösungsmittelgemisch Essigester-Äthanol-Wasser (10:2:3) überlagerten sich die Cardenolid- und Flavonzonen, so daß zwar mit Sicherheit zwei Stoffklassen zu rechnen, eine genaue Gliederung aber unmöglich war.

4) Papierchromatographische Voruntersuchung des Essigester-Äthanol-Auszuges

Um exakt markierte Substanzflecke auf dem Chromatogramm zu erhalten, war es notwendig, dem Gesamtpflanzenauszug die hydrophilen Substanzen - siehe oben - zu entziehen. Wir schüttelten mit wassergesättigtem Essigester-Äthanol (1:1) aus, schüttelten das organische Lösungsmittel im Vakuum ab und chromatographierten das im Wasser aufgenommenen Rückstand wie unter a) 2. (siehe S. 7). Die Flecken waren jetzt schärfer begrenzt, die Überlagerungen aber die gleichen wie unter a) 2. β) angegeben. Wir vermuteten daher eine Trennung des Essigester-Äthanol-Auszuges in eine Cardenolid- und eine Begleitstoff-Fraktion, um jedes dieser Gemische dann grundsätzlich getrennt zu chromatographieren.

⁵⁹⁾ siehe auch LEHRING, H. u. PATT, P.: Arzneimittel-Forsch. 8, 554 (1958)

c) Selektive Abtrennung der Begleitstoffe und Isolierung der einzelnen Cardenolide

1) Polyamidchromatographie (Perlonsäule C-F)

Nachdem in unserem Institut die Säulenchromatographie mit dem Polyamid Perlon nicht nur zur Flavontrennung⁶⁰⁾, sondern vor allem auch zur Extraktreinigung und Gerbstoffentfernung⁶¹⁾ mit Erfolg verwandt wurde, versuchten wir dieses Verfahren auch im vorliegenden Falle.

Der in Aqua dest. suspendierte Rückstand der Essigester-Äthanol-Ausschüttelung (siehe S. 8), der Cardenolide, Flavone, Säuren und Ballaststoffe (Gerbstoffe, Chlorophyllreste usw.) enthielt, wurde auf eine Perlonsäule aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die Säulendurchläufe waren im Tageslicht gelbbraun gefärbt und fluoreszierten im UV-Licht stark blau. Am Start verblieb neben restlichem Chlorophyll ein breiter, brauner Substanzring, der auch bei längerem Waschen nicht mitlief. Eine schmale, im UV-Licht dunkle Zone wanderte dagegen mit dem Lösungsmittel und wurde abgetrennt (= Lösung IV). Nachdem mit Aqua dest. alle wasserlöslichen Substanzen eluiert waren (Prüfung mit Keddes Reagens), wurde mit Methanol das adsorbierte Flavongemisch vom Polyamid gelöst.

Die Säulendurchläufe der Perlonsäule C-F wurden wie folgt eingeteilt:

1. wässriger Vorlauf,
2. wässrige, im UV-Licht stark blau fluoreszierende Hauptfraktion,
3. wässriger Nachlauf,
4. wässrig-methanolisches Eluat (blau und dunkel im UV-Licht),
5. methanolische Hauptfraktion (dunkel),
6. methanolischer Nachlauf.

Die sechs Fraktionen wurden im Vakuum eingeeengt und chromatographiert.

60) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H. u. LEEB, W.: Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

61) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H., IZQUIERDO-SORLI, J. u. ENDRES, L.: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 269 (1958)

α) Papierchromatographie der Cardenolide

R. TSCHESCHE und Mitarbeiter⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾ brachten für die Chromatographie der Convallaria-Cardenolide als Lösungsmittelsystem Pentanol/Wasser in Vorschlag. Sie tränkten Chromatographiepapier mit der wassergesättigten organischen Phase und entwickelten mit der pentanolgesättigten Unterphase. Die Entwicklungszeit für ein Rundfilterchromatogramm betrug 10 Stunden.

R. LAUFKE⁶⁵⁾ variierte die Methodik von R. TSCHESCHE und F. SEEHOFER⁶²⁾, indem er als Lösungsmittelsystem Chloroform-iso-Amylalkohol-Wasser (1:1:1) nahm und bei gleicher Laufzeit (Rundfilterchromatogramm = 10 Stunden) größere Trennschärfen erhielt.

H. ERBRING und Mitarbeiter⁶⁶⁾ entwickelten eine Rundfilterchromatographie, in der sie wassergesättigten Essigester als mobile Phase verwendeten. Die bei einer Laufzeit von 10 bis 12 Stunden erzielte Trennschärfe gestattete eine quantitative Auswertung.

Die angeführten Arbeiten erfordern nicht nur eine verhältnismäßig lange Ausführungszeit (10 bis 12 Stunden), sondern geben auch nur begrenzte Vergleichsmöglichkeiten mitlaufender Substanzen.

In Vorversuchen prüften wir die aufsteigende Methode und kamen im Gegensatz zu R. LAUFKE⁶⁷⁾ zu befriedigenden Ergebnissen. Die Lösungen wurden auf 20 x 24,5 cm große Chromatogramme

62) TSCHESCHE, R., GRIMMER, G. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 86, 1235 (1953)

63) TSCHESCHE, R. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 87, 1108 (1954)

64) SEEHOFER, F.: Dissertation, Hamburg 1954

65) LAUFKE, R.: Pharmazie 12, 745 (1957)

66) ERBRING, H., PATT, P. u. FREY, N.: Arzneimittel-Forsch. 8, 289 (1958)

67) LAUFKE, R.: Pharmazie 12, 746 (1957)

aufgetragen, in der von H. ERBRING und Mitarbeitern⁶⁸⁾ angegebenen Weise mit Essigester-gesättigtem Wasser befeuchtet und in der Oberphase in einer Laufzeit von 2 Stunden entwickelt. Die Sichtbarmachung der Cardenolide erfolgte nach dem Trocknen mit dem Reagens nach D. L. KEDDE⁶⁹⁾⁷⁰⁾. Im System Essigester-Wasser hatten die einzelnen Cardenolide folgende R_F -Werte: A = 0,025; B = 0,03; C = 0,10; D = 0,17 (Convallatoxin); E = 0,27; F = 0,38; G = 0,55; H = 0,79; I = 0,90.

β) Papierchromatographie der Begleitstoffe

Aus der papierchromatographischen Voruntersuchung des Gesamtpflanzenauszuges (siehe S. 7) war hervorgegangen, daß bei den Convallaria-Begleitstoffen bevorzugt Flavone und Säuren zu erwarten waren. Wir chromatographierten daher zunächst im System Essigester-Ameisensäure-Wasser (1:1:2). Die R_F -Werte und Farbreaktionen der einzelnen Substanzen des Liquor Plumbi subacetici DAB 6 bzw. Liquor Convallariae DAB 6 gibt Tabelle 1 (siehe S. 12) wieder.

68) ERBRING, H., PATT, P. u. FREY, N.: Arzneimittel-Forsch. 8 289 (1958)

69) KEDDE, D. L.: Dissertation, Leiden 1946

70) BUSH, D. L. u. TAYLOR, D. A. H.: Biochem. J. 52, 643 (1952)

T a b e l l e 1

Übersicht über die in Herba Convallariae majalis papier-
chromatographisch nachgewiesenen Begleitstoffe im Essig-
ester-Äthanol-Auszug⁷¹⁾

Vermutl. Inhaltsstoff	R _F -Wert	Sprühreagens	Farbe im UV-Licht
Flavonglykosid IK	0,38	bas. Bleiazetat	stark goldgelb
Flavonglykosid R	0,36	" "	schwach orange, z.T. von IK u. KI überlagert
Flavonglykosid KI	0,33	" "	goldgelb
Säure C	0,60	" "	mattgrün bis gelbgrün
" "	0,60	Reakt. NH ₃	blaugrün
Säure K	0,85	" "	fahlblau
" "	0,85	bas. Bleiazetat	mattgrün bis gelbgrün
Säure F	0,90	" "	türkis
" "	0,90	Reakt. NH ₃	violett
Substanz R	0,48 W/E	bas. Bleiazetat	rostrot
Substanz V	0,64 W/E	" "	violett

Untersuchung der Polyamidfraktionen

Von den sechs Fraktionen der Perlonsäule C-F (siehe S. 9) wurden aufsteigende (siehe S. 10) und absteigende (siehe S. 11) Chromatogramme angefertigt: Beide Arten von Chromatogrammen zeigten unbesprüht im UV-Licht in der ersten Fraktion keine, in der zweiten bis fünften Fraktion blau fluoreszierende Säureflecke. Absteigend chromatographiert, ließen unbesprüht kräftige braune Zonen Flavone in den Fraktionen vier bis sechs vermuten. Auf den

71) vgl. auch COBET, R.: Dissertation, München 1957

aufsteigenden Chromatogrammen wurden mit dem Reagens nach Kedde die Cardenolide, auf den absteigenden mit basischem Bleiazetat die Flavone sichtbar gemacht. Es enthielten die Fraktionen

- | | |
|--|--------------|
| 1 : 5 Cardenolide ohne Säuren, ohne Flavone | } = Lösung I |
| 2 + 3 : 9 Cardenolide mit Säuren und kein Flavon | |
| 4 : Hauptcardenolid D mit hydrophilem Flavon KI, etwas Säure = Lösung IV | |
| 5 + 6 : Cardenolid-freie Flavone mit Säuren | = Lösung II. |

Erst der Vergleich beider Chromatogramme gestattete eine sichere Entscheidung, ob eine flavon- bzw. cardenolidfreie Fraktion vorlag.

Flavonfreie Cardenolidlösungen (I) einerseits, und cardenolidfreie Flavonlösungen (II) andererseits wurden vereinigt und getrennt weiter verarbeitet. Der Mischfraktion IV konnte bei einer Wiederholung das Cardenolid selektiv entzogen werden.

Aus der Lösung I schied sich nach wenigen Tagen (meist schon beim Einengen im Vakuum) bei Zimmertemperatur ein rein weißes Mischkristallisat III ab. Es wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und chromatographiert. Das Kristallisat enthielt sieben Cardenolide (Reaktion mit Keddes Reagens) : A, B, C, D, E, F und I, während Säuren, die Substanzen R und V und zwei Cardenolide (G und H) quantitativ in Lösung blieben.

Da die herzwirksamen Convallaria-Glykoside auf Grund ihrer engen chemischen Verwandtschaft nur sehr geringe Unterschiede in ihren Löslichkeitsverhältnissen erwarten ließen - die Zusammensetzung des Mischkristallisates außerdem weitgehend zugunsten der Convallatoxin-Konzentration (etwa 50% aller Glykoside) verschoben war - versuchten wir eine Auftrennung des Komplexes mit Hilfe der multiplikativen Verteilung.

2) Gegenstromverteilung

Die Gegenstromverteilung oder multiplikative Verteilung nach L. C. CRAIG⁷²⁾ hat sich sowohl bei analytischen Arbeiten im Laboratorium als auch bei präparativen Isolierungsaufgaben im technischen Maßstab bewährt: Chemisch ähnliche, instabile und seltene Naturstoffe können unter äußerst milden Bedingungen gereinigt und dargestellt werden⁷³⁾⁷⁴⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾.

Zur Trennung des Cardenolid-Komplexes aus Convallaria majalis erschien uns daher diese Methode aussichtsreich, obwohl bisherige Arbeiten auch hier nur zu Teilerfolgen, d.h. meist nur zur Isolierung des Hauptglykosides Convallatoxin, geführt hatten⁷⁷⁾⁷⁸⁾⁷⁹⁾.

Die Papierchromatographie der Cardenolide, die im System Essigester-Wasser gute Ergebnisse brachte, gab uns Anregung, von ihm als Grundsystem für eine multiplikative Verteilung auszugehen. Nach orientierenden Vorversuchen verwendeten wir folgende Kombination:

8 Volumenteile Essigester, 1,5 Volumenteile iso-Amylalkohol,
1,5 Volumenteile Äthanol, 8,5 Volumenteile Wasser und
0,5 Volumenteile Trichloräthylen.

Die Unterphase wurde nach dem Absättigen in eine 200stufige, vollautomatische Verteilungsbatterie nach F. A. v. METZSCH⁸⁰⁾ eingefüllt (Kapazität eines Elementes = 100 ml).

72) CRAIG, L. C.: J. biol. Chemistry 155, 519 (1944)

73) HECKER, E.: "Verteilungsverfahren im Laboratorium", Weinheim/Bergstraße 1955

74) v. METZSCH, F. A.: Angew. Chem. 65, 586 (1953);
Angew. Chem. 68, 323 (1956)

75) HÜRHAMMER, L. u. WAGNER, H.: Pharmaz. Ztg. 102, 278 (1957)

76) HÜRHAMMER, L. u. WAGNER, H.: Pharmaz. Ztg. 102, 537 (1957)

77) KOENIG, H.-B.: Dissertation, Hamburg 1950

78) SEEHOFER, F.: Dissertation, Hamburg 1954

79) LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 581 (1957)

80) v. METZSCH, F. A.: Chem.-Ing.-Techn. 25, 66 (1953)

Von den chromatographisch reinen Lösungen C, D, E, F und I hatte D nach zehntägigem Stehen bei Zimmertemperatur 750 mg farblose Nadeln ausgeschieden, die als schmelzpunktreines Convallatoxin (Mischschmelzpunkt mit authentischem Convallatoxin der Firma Roth, Stuttgart, = $241-242^{\circ}\text{C}$) identifiziert werden konnten.

Die Cardenolide A und B lagen in sehr geringer Konzentration vor, - wir nehmen an, daß A und B mit den Glykosiden I und II identisch sind, für die H. ERBRING und Mitarbeiter⁸¹⁾ 82)83) einen Gehalt von 2-3,5% (bezogen auf die Gesamtcardenolide) angeben - so daß auf ihre Reindarstellung verzichtet wurde. Grundsätzlich sind aber auch diese beiden Glykoside durch Erhöhung der Verteilungsschritte bzw. eine erneute Verteilung zu gewinnen.

Während die Glykoside C, F und I sich verhältnismäßig leicht aus dem Gemisch lösten und die Reinfraaktionen bald Kristalle abchieden, war das Cardenolid E besonders schwierig zu gewinnen: Bei 100 Verteilungsschritten z.B. waren C, D, F und I bereits weitgehend aufgetrennt, E dagegen entweder mit D oder F vergesellschaftet.

81) ERBRING, H. u. PATT, P.: Arzneimittel-Forsch. 8, 554 (1958)

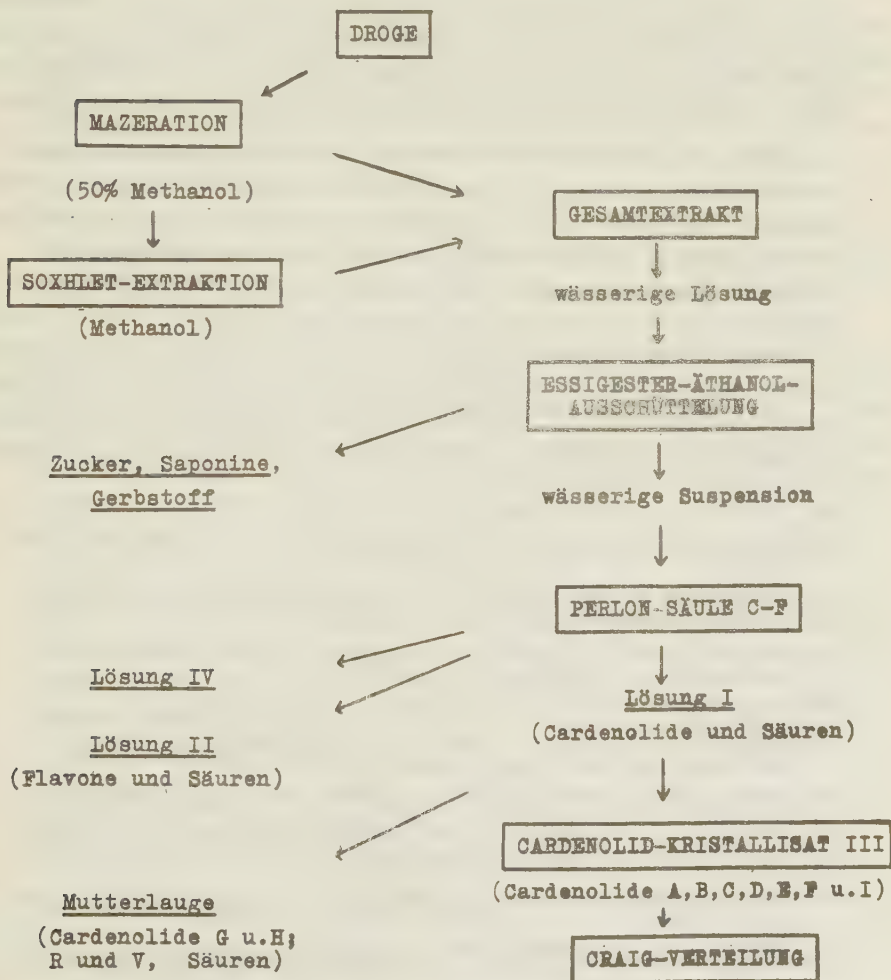
82) ERBRING, H., PATT, P. u. FREY, N.: Arzneimittel-Forsch. 8, 289 (1958)

83) ERBRING, H., KOCH, F. E., LORENZ, D., MADAUS, R.,
ORZECOWSKI, G. u. PATT, P.: Medizinische 35, 1326 (1958)

3) Ergebnisse und Diskussion der Cardenolid-Trennung

Auf Grund dieser Ergebnisse schlagen wir zur präparativen Gewinnung aller Convallaria-Cardenolide folgenden Arbeitsgang vor:

Schematische Darstellung der Cardenolid-Trennung



Wie auch andere Autoren⁸⁴⁾⁸⁵⁾⁸⁶⁾ vorschlugen, stellten wir der methanolischen Soxhlet-Extraktion der Droge eine 48stündige Mazeration mit 50%igem Methanol voran. Erst die Kombination beider Methoden führte zu einer nahezu quantitativen Cardenolid-Extraktion.

Der von Chlorophyll weitgehend befreite Gesamtextrakt wurde mit wassergesättigtem Äthanol-Essigester (1:1) ausgeschüttelt, so daß Zucker, Saponine und ein Gerbstoffanteil in der wässrigen Phase verblieben. Diese Manipulation war notwendig, um durch die Saponinentfernung für alle weiteren Arbeitsgänge Emulsionsbildungen zu vermeiden und exakte Löslichkeitsverhältnisse zu schaffen.

Eine Ballaststoffausfällung mit Blei- oder anderen Schwermetallsalzen, wie sie viele Arbeitskreise bei der Gewinnung herzwirksamer Glykoside⁸⁷⁾⁻⁹⁵⁾ durchführen, genügte nicht als weitere Vorreinigung für eine Convallaria-Cardenolid-Auftrennung: R. LAUFKE⁹⁶⁾ z.B. mußte einer multiplikativen Verteilung einen Entschäumer zusetzen, sowohl bei Substanzgemischen, die zuvor durch Ballaststoff-Fällungen gereinigt waren als auch bei ungereinigten, um Wartezeiten von 20 bis 70 Minuten zwischen den einzelnen Verteilungsschritten zu erreichen. Auch die Gewinnung einer reinen Cardenolid-Mischfraktion durch Adsorption der Glykoside an Kohle

84) LAUFKE, R.: Planta med. 5, 69 (1957)

85) DBP 864 312, ZIPF, K. u. HEINRICH, W., Fa. Goedecke & Co., Berlin

86) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 417 (1957)

87) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 418 (1957)

88) KARRER, W.: Helv. chim. Acta 12, 506 (1929)

89) STOLL, A., SUTER, E., KREIS, W., BUSSEMAKER, B. B. u. HOFMANN, A.: Helv. chim. Acta 16, 703 (1933)

90) STOLL, A. u. KREIS, W.: Helv. chim. Acta 16, 1049 (1933)

91) STOLL, A. u. KREIS, W.: Helv. chim. Acta 18, 120 (1935)

92) DBP 490 648, Hoffmann-La Roche & Co.

93) DBP 864 312, ZIPF, K. u. HEINRICH, W., Fa. Goedecke & Co., Berlin, S. 1

94) MOHR, K. u. REICHSTEIN, T.: Pharmac. Acta Helvetiae 23, 369 (1948)

95) TSCHESCHE, R. u. SEEHOFER, F.: Chem. Ber. 87, 1108 (1954)

96) LAUFKE, R.: Pharmaz. Ztg. 103, 599 (1958)

war wenig befriedigend⁹⁷⁾⁹⁸⁾⁹⁹⁾.

Demgegenüber erreichten wir durch Säulenchromatographie an Perlon und Waschen mit Wasser

1. die quantitative Entfernung des restlichen Chlorophylls,
2. eine Verringerung des Gerbstoffgehaltes,
3. die Trennung in eine flavonfreie Cardenolid-(Säure)- (= I) und eine cardenolidfreie Flavon-(Säure)-Lösung (= II), die zu einem reinen Cardenolid-Mischkristallisat führt.

Dieses rein weiße, von allen Begleitstoffen befreite Mischkristallisat III wurde einer multiplikativen Verteilung unterworfen¹⁰⁰⁾. Bei der Wahl der Lösungsmittelkomponenten (Essigester, Äthanol, iso-Amylalkohol, Trichloräthylen, Wasser) verzichteten wir bewußt auf C h l o r o f o r m, das Emulsionsbildung begünstigt. Es gelang somit, ein Cardenolid - M i s c h k r i s t a l l i s a t mit einem c h l o r o f o r m f r e i e n Lösungsmittelsystem zu verteilen, so daß keine Emulsionsbildung eintrat und 4 Minuten Ruhezeit zur Phasentrennung genügten.

Die Glykoside C, D, E, F und I des Mischkristallisates wurden in papierchromatographisch einheitlichen Fraktionen - teils kristallin, teils in kristallisationswilligen Lösungen - gewonnen. Die Cardenolide A und B - wie auch G und H, wenn sie auskristallisieren - dürften bei Erhöhung der Verteilungsstufenanzahl greifbar werden.

Die von uns vorgeschlagene aufsteigende Papierchromatographie der Cardenolide im System Essigester-Wasser war für die Analyse der Verteilungsfractionen ein unerläßliches Hilfsmittel: Mit m i n i m a l e m a p p a r a t i v e m A u f w a n d lieferte sie bei k ü r z e s t e r L a u f z e i t exakte Chromatogramme.

97) BOLTZE, K.-H. u. LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 419 (1957)

98) MOHR, K. u. REICHSTEIN, T.: Pharmac. Acta Helvetiae 23, 369 (1948)

99) KARRER, W.: Helv. chim. Acta 12, 506 (1929)

100) vgl. hierzu: LAUFKE, R.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 290/62, 582 (1957)

Gegenüber älteren Verfahren erfordert dieser einfache und exakt reproduzierbare Arbeitsgang zur Auftrennung des Convallaria-Cardenolid-Komplexes billige Lösungsmittel (bevorzugt Wasser und Essigester; bisher Chloroform-Äthanol). Durch Kombination moderner Trennungsmethoden¹⁰¹⁾

1. Adsorptionschromatographie (Polyamid-Säule),
2. Verteilungschromatographie nach Craig und
3. Papierchromatographie

können bei geringem Zeitaufwand alle herzwirksamen Glykoside der Convallaria majalis präparativ gewonnen werden.

C. Versuche zur Isolierung der Begleitstoffe

a) Versuche zur Isolierung der Flavone

Lösung II der Perlonsäule C-F wurde im System Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) absteigend chromatographiert und mit basischem Bleiazetat besprüht: Hauptbestandteil war das im UV-Licht goldgelbe Flavon IK (R_F -Wert = 0,37-0,38), das zum Teil den geringen Anteil des Flavons R (R_F -Wert = 0,36, orangefarben im UV-Licht) überdeckte. Auch die Konzentration von höher laufenden Säuren (R_F -Wert = 0,6-0,9) lag weit unter der des Hauptflavons.

Zur Auftrennung wurde Lösung II in eine wässrige Suspension überführt, wiederum auf eine Polyamidsäule gegeben und mit 30%igem Isopropanol eluiert. Bald nach dem Start zeigte die Säule im UV-Licht folgende Gliederung: Einer stark blau fluoreszierenden Front folgte eine breite dunkle Flavonzone, während ein schmales braunes Flavonband nur zögernd mit dem Lösungsmittel mitlief.

101) MUSSO, H.: Naturwissenschaften 5, 97 (1958)

Wir fraktionierten die Säulendurchläufe in *)

1. stark blau fluoreszierenden Vorlauf,
- 2.-11. dunkle Flavon-Hauptfraktionen.
- 12.-14. dunklen Nachlauf.

Die 14 Eluate (zum Teil im Vakuum eingeeengt) wurden in Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) absteigend chromatographiert und mit basischem Bleiazetat besprüht: Die Fraktionen enthielten

1. flavonfreie Säuren (= Lösung V),
2. Flavon IK mit wenig Säure,
- 3.-11. Flavon IK,
12. Flavone IK und R,
- 13.-14. Flavon R mit wenig IK.

Die Mischfraktionen 2 und 1² wurden zur Wiederholung der Säulenchromatographie zu Lösung II zurückgegeben. Den Fraktionen 13 und 14 konnte auf einer neuen Perlonsäule mit 30%igem Isopropanol das Flavon IK selektiv entzogen werden¹⁰²⁾.

1) Identifizierung von Flavon R

Da die wässrig-methanolische Lösung des Flavons auch nach Wochen nicht kristallisierte, versuchten wir durch die in Tabelle 2 und 3 wiedergegebene vergleichende Papierchromatographie einige Anhaltspunkte über seine Art und die seiner Komponenten zu bekommen:

T a b e l l e 2

Papierchromatographie des Flavonglykosides R

	R _F -Wert in AAW	R _F -Wert in BEW	im UV-Licht	
			unbesprüht	mit bas. Bleiazetat
Flavon R	0,36	0,38	dunkel	orangefarben
Rutin	0,36	0,38	dunkel	orangefarben

102) vgl. hierzu: PROBST, W.: Dissertation, München 1958, S.8, Trennung von Flavon I und II

*) Diese Angaben beziehen sich auf eine Chromatographie an dem Polyamid DURETHAN der Firma Bayer-Leverkusen. Bei Verwendung des entsprechenden Präparates der BASF, Ludwigshafen, liegen andere Adsorptionsverhältnisse vor.

Eine 1stündige Hydrolyse von Flavonglykosid R mit 2%iger Salzsäure führte zu folgenden Hydrolysenprodukten:

T a b e l l e 3

Papierchromatographie der Hydrolysenprodukte von Flavon R

	R _F -Wert in IAW*)	R _F -Wert in AAW*)	R _F -Werte in PEW, bespr. n.Patridge*)	im UV-Licht	
				unbespr.	mit bas. Bleiazetat
a) <u>AGLYKON:</u>					
Aglykon R	0,22	0,83		gelb	orange
Quercetin	0,22	0,82		gelb	orange
b) <u>ZUCKER:</u>					
Zucker R			0,46 u. 0,63		
Glukose u. Rhamnose			0,46 u. 0,63		

Auf Grund dieser Daten nehmen wir an, daß es sich bei dem Flavonnebenglykosid R um R u t i n handelt.

2) Identifizierung von Flavon IK

Auch das Hauptflavon IK konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden. Die Papierchromatographie zeigte in drei verschiedenen Systemen bei normaler Laufzeit einen kräftigen, aber scharf begrenzten Substanzfleck. Nach einstündiger Hydrolyse mit 2%iger Salzsäure ließen sich durch vergleichende Papierchromatographie reichlich Isorhamnetin und wenig Kämpferol, reichlich Rhamnose, Galactose und wenig Glucose nachweisen. Die beiden Aglykone deuteten darauf hin, daß es sich bei dem Flavon IK um z w e i äußerst ähnliche Flavone mit dem gleichen R_F-Wert handelte. Außerdem war bei einer Laufhöhe von 0,38 (AAW*) das Vorliegen e i n e s Triglykosides unwahrscheinlich. Wir ließen nun ein Durchlaufchromatogramm 44 Stun-

*) Lösungsmittelsysteme: IAW = Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5), AAW = Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3), PEW = Pyridin-Essigester-Wasser (1:2:2)

den in BEW^{*)} laufen, so daß die Substanzen bis an die Front wanderten. Mit basischem Bleiazetat besprüht, wurde deutlich, daß sich aus dem kräftigen, goldgelben Isorhamnetin-Glykosidfläck eine schwache, grüngelbe Kämpferol-Glykosidspitze herausgehoben hatte. Eine Trennung dieser beiden Stoffe hielten wir - wenn überhaupt - nur mit Hilfe der multiplikativen Verteilung für möglich.

Das Lösungsmittel Essigester(8,5 Volumenteile)-iso-Amylalkohol(1 Volumenteil)-Trichloräthylen(0,5 Volumenteile)-Wasser (10 Volumenteile) hatte einen Verteilungskoeffizienten für Rutin = 0,77; Kämpferol-3-rhamnoglucosid = 1,5; Flavone IK = 1,1. Eine Verteilung von etwa 1 g Festsubstanz der Flavone IK über 192 Stufen in diesem Lösungsmittel ergab:

Fraktion 1 - 25 : braune, nicht näher zu definierende Ballaststoffe,

26 - 47 : leer,

48 - 85 : Flavone I und K zusammen (bewiesen durch Hydrolysen und Durchlaufchromatogramme),

86 - 192 : leer.

Wir vereinigten die 38 Flavonfraktionen und unterwarfen sie einer erneuten Verteilung mit dem gleichen Lösungsmittelsystem, da wir nach der Ballaststoffabtrennung veränderte Löslichkeitsverhältnisse erwarteten. Die zweite Gegenstromverteilung führte über 301 Stufen, wobei die 200stufige, vollautomatische Verteilungsapparatur zum Rundlauf geschlossen wurde.

Die Substanzverteilung war folgende:

Fraktion 1 - 4 : nochmals wenig Ballaststoffe (vor dem Rundlauf entnommen),

5 - 74 : leer,

75 - 135 : Flavone I und K zusammen (bewiesen durch Hydrolysen und Durchlaufchromatogramme),

136 - 301 : leer.

*) Lösungsmittelsystem: BEW = Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Die 60 Flavonfraktionen der zweiten Verteilung wurden vereinigt, eingeeignet und in verdünnt-äthanolischer Lösung bei Zimmertemperatur stengelassen. Nach einigen Wochen schied sich ein Kristallbüschel (siehe Abbildung) aus.



Von einem Bruchstück wurde der Schmelzpunkt ($= 176-177^{\circ} \text{C}$) bestimmt, von einem anderen ein UV-Spektrum aufgenommen:
 $\lambda_{\text{max.}} = 255 \text{ m}\mu$ und $355-357 \text{ m}\mu$; das BEW^{*)}-Durchlaufchromatogramm zeigte mit basischem Bleiazetat besprüht einen goldgelben Isorhamnetin-Glykosidfleck, der mit authentischem Isorhamnetin-3-rhamnoglucoosid die gleiche Laufhöhe hatte. Wir vermuten daher, daß es sich bei dem Hauptflavonglykosid der *Convallaria majalis* um Isorhamnetin-3-rhamnoglucoosid handelt.

Eine nähere Charakterisierung des Kämpferol-Glykosides gelang uns noch nicht.

3) Identifizierung von Flavon KI

Lösung IV der Perlonsäule C-F (siehe S. 13) wurde im Lösungsmittelsystem AAW^{*)} absteigend chromatographiert: Sie enthielt

^{*)} Lösungsmittelsysteme:

BEW = Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

AAW = Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Flavon IK, Säuren und Cardenolid D. Zur Entfernung der Säuren wurde Lösung IV ausgeäthert (Ätherrückstand VI zu Lösung V der Perlonsäule F) und der säurefreien wässerigen Phase mit Chloroform das Cardenolid entzogen.

Die Flavonlösung KI wurde, als sich auch hier keine Kristalle abschieden, 1 Stunde mit 2%iger Salzsäure hydrolysiert: Als Hydrolysenprodukte ließen sich auf Grund einer vergleichenden Papierchromatographie mit entsprechenden Testsubstanzen Isorhamnetin und Kämpferol sowie Rhamnose, Galactose und Glucose nachweisen. Nach den Ergebnissen bei den Trennungsversuchen der Flavone IK wurde von einer Weiteruntersuchung von KI abgesehen, zumal KI nur in geringen Konzentrationen zur Verfügung standen.

b) Organische Säuren

Reine Säurefraktionen waren bisher in Lösung V der Perlonsäule F (vgl. S. 21) und im Ätherrückstand VI der Lösung IV (vgl. unter Flavon KI, s. oben) angefallen. Aber auch aus der nicht mehr kristallisierenden Mutterlauge des Mischkristallisates III (siehe S. 13) ließen sich mit basischem Bleiazetat noch Säuren und die Substanzen R und V herausfällen. Der Bleiniederschlag wurde abfiltriert, das cardenolidhaltige Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit.

Die Bleifällung wurde mit wenig Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das von Bleisulfid und Schwefelwasserstoff befreite Filtrat wurde auf einer weiteren Perlonsäule S mit Wasser gewaschen: Die Substanzen R und V fanden sich in den ersten wässerigen Durchläufen (Lösung VII), während die Säuren mit Methanol eluiert wurden.

Die eingeengte Säurefraktion VIII wurde mit der Lösung V der Perlonsäule F und dem Ätherrückstand VI der Lösung IV vereinigt und einer vergleichenden Papierchromatographie (siehe Tabelle 4, S. 26) unterworfen:

T a b e l l e 4

Vergleichende Papierchromatographie der Säuren

	R_F -Wert in 15% ES*)	R_F -Wert in AAW*)	im UV-Licht	
			Ammoniak	bas. Bleiazetat
Säure C	0,71	0,60	grünblau	mattgelb-grüngelb
Säure K	0,45	0,85	fahlblau	mattgelb-grüngelb
Säure F	0,53	0,90	viol.blau	türkis
Chlorogensäure	0,71	0,60	grünblau	mattgelb-grüngelb
Kaffeesäure	0,45	0,85	fahlblau	mattgelb-grüngelb
Ferulasäure	0,53	0,90	viol.blau	türkis

Aus der Übereinstimmung dieser Eigenschaften ergibt sich die Identität der Säure C mit C h l o r o g e n s ä u r e , der Säure K mit K a f f e e s ä u r e¹⁰³⁾ und der Säure F mit F e - r u l a s ä u r e .

*) Substanzen R und V

Die Lösung VII (siehe S. 25) wurde in wassergesättigtem Essigester aufsteigend chromatographiert: Mit basischem Bleiazetat besprüht, traten im UV-Licht ein rostroter (= Substanz R; R_F -Wert = 0,48) und ein violetter Substanzfleck (= V; R_F -Wert = 0,64) auf, die unbesprüht nicht sichtbar gewesen waren.

Diese beiden Stoffe reagierten in wässriger Lösung sauer und waren mit basischem Bleiazetat fällbar. Sie lösten sich in Wasser, Äther und Chloroform, so daß anzunehmen war, daß es sich um Stoffe mit binären Eigenschaften, wie sie z.B. von Saponinen, manchen Lipoiden und einigen Gerbstofftypen her bekannt sind, handeln könnte.

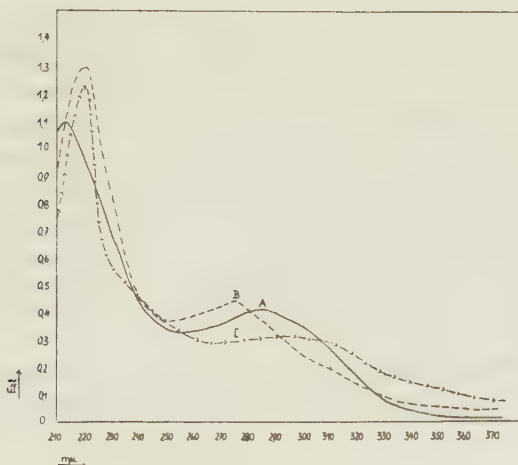
103) Bestätigung von: CHARAUX, Ch. J., zit. in HERRMANN, K.: Pharmazie 11, 433 (1956)

*) Lösungsmittelsysteme: ES = 15%ige Essigsäure;
AAW = Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Die Substanzen R und V wurden durch saure Hydrolyse (bis 10% Schwefelsäure, 1 Stunde) nicht verändert, aber bei alkalischer Hydrolyse schon mit 1% Kalilauge in einer Stunde quantitativ abgebaut.

Auf dem Papierchromatogramm trat mit TOLLENS-Reagens¹⁰⁴⁾ eine schwachgraue Färbung ein, während die Reaktion mit Eisen-III-chlorid-Lösung und KEDDES-Reagens auch in vitro negativ war.

Von der wässrigen Lösung der beiden Stoffe nahmen wir ein UV-Spektrum auf:



UV-Spektren der Substanzen R und V

A = R+V (in Wasser); B = R+V+Na.acetat; C = R+V in n-Na(OH)

104) HOUBEN-WEYL: "Methoden der organischen Chemie" (Herausgeber E. MÜLLER) Stuttgart, 1953, Bd. II, S. 442 : Reaktion auf aliphatische und aromatische Aldehyde, manche aromatischen Amine, mehrwertige Phenole, Aminophenole, α -Diketone u.a.

Das UV-Spektrum des Gemisches (A) zeigte zwei ausgeprägte Maxima bei $\lambda = 212,5 \text{ m}\mu$ und $\lambda = 285 \text{ m}\mu$, die nach Zusatz von n-Natronlauge (C) eine geringe Rotverschiebung von $\lambda = 212 \text{ m}\mu$ nach $\lambda = 220 \text{ m}\mu$, bzw. $\lambda = 285 \text{ m}\mu$ nach $\lambda = 295 \text{ m}\mu$ erfuhren. In gesättigter Natriumazetatlösung (B) dagegen verschob sich die erste Bande von $\lambda = 212,5 \text{ m}\mu$ nach $\lambda = 215 \text{ m}\mu$, während das zweite Maximum einer hypsochromen Verschiebung von $\lambda = 285 \text{ m}\mu$ nach $\lambda = 275 \text{ m}\mu$ unterlag.

Der Versuch, die Mischlösung der beiden Stoffe zu kristallisieren oder in eine definierte Verbindung überzuführen, war wegen der geringen Konzentration nicht möglich.

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse kann über die Substanzen R und V folgendes gesagt werden: Die Zugehörigkeit zu einer Steroid-Konfiguration dürfte ausgeschlossen sein; das übrige Verhalten - namentlich die Reaktion mit TOLLENS-Reagens - ließ auf Verbindungen mit phenolischem oder chinoidem Charakter schließen, wobei vermutlich keine monomeren, sondern höher kondensierte Systeme vorliegen dürften, wie man sie z.B. bei der Ellagsäure oder Chebulsäure antrifft. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die große Ähnlichkeit des UV-Spektrums mit dem der Chebulsäure.

Daß durch Verbindungen dieser Art eine Lösungsvermittlung für andere Stoffe erreicht werden kann, würde gut erklärt werden.

d) Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach der Untersuchung der Convallaria-Begleitstoffe stellen wir in Tabelle 5 (siehe S. 29) die von uns nachgewiesenen und in der Literatur bisher nicht genannten Inhaltsstoffe zusammen:

T a b e l l e 5

R _F -Wert in*)		unbespr.	besprüht mit	Farbe	chem.Konstitution
0,33	AAW	dunkel	bas.Bleiazet.	gold-gelb	Isorhamnetin-Kämpferol-(tri)-glykosid
0,36	AAW	dunkel	bas.Bleiazet.	orange	Rutin
0,38	AAW	dunkel	bas.Bleiazet.	gold-gelb	Isorhamnetin-Kämpferol-(di)-glykosid
0,60	AAW	blau	bas.Bleiazet.	matt-grün	Chlorogensäure
0,85	AAW	blau	bas.Bleiazet.	matt-grün	Kaffeesäure
0,90	AAW	blau	bas.Bleiazet.	türkis	Ferulasäure
0,48	W/E	-	bas.Bleiazet.	rost-rot	} vermutlich: Gerbstoffphenol vom Typ der Ellagsäure oder Chebulsäure
0,64	W/E	-	bas.Bleiazet.	violett	

*) Lösungsmittelsysteme:

AAW = Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

W/E = Wasser-Essigester

B. Die sich aus den einzelnen Untersuchungen ergebenden

Schl u ß f o l g e r u n g e n

a) Über eine mögliche Lösungsvermittelnde Eigenschaft der Substanzen R und V für Cardenolide

Nach der Untersuchung der Substanzen R und V (siehe S.26) wird ein der Ansicht, daß es sich bei ihnen um höherkondensierte, cardenolische oder chinolide Verbindungen handeln könnte, die bei anderen Stoffen zu einer Löslichkeitsveränderung führen. Diese Vermutung stützt sich insbesondere auf die Tatsache, daß die Mutterlauge des *Miscodrisyllisates* III - selbst nach weiterem Waschen - keine harzwirksamen Glykoside ausscheidet. Erst nach Zugabe von einer verdünnten Bleifällung, durch die die Substanzen R und V sowie Säuren und Gerbstoffe entfernt werden, setzt die Kristallisation wieder ein. Wenn es richtig ist, daß die *Scyllaria*-Cardenolide nicht als Tannoidverbindungen vorliegen¹⁰⁵⁾, wie dies von den *Scilla*-¹⁰⁶⁾ und *Digitalis*glykosiden¹⁰⁷⁾¹⁰⁸⁾ bekannt ist, und durch eine Bleifällung von gebundenem Gerbstoff befreit, d.h. hydrophobiert werden können, dann dürfte wohl daraus zu schließen sein, daß die Substanzen R und V in der Hauptsache neben Säuren und ungebundenen Gerbstoffen über die Lösungsvermittelnden Eigenschaften verfügen und eine weitere Cardenolid-Abscheidung verhindern.

Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang die gute Wasserlöslichkeit des Cardenolid-Gesamtkomplexes (mit R und V, Säuren und Gerbstoffen), der sich ohne Schwierigkeit als Lösung I

105) LAUFKE, R.: Pharmazie 12, 745 (1957)

106) STOLL, A., SUTER, E., KREIS, W., BUSSEMAKER, B. B. u. HOFFMANN, A.: Helv. chim. Acta 16, 703 (1933)

107) STOLL, A. u. KREIS, W.: Helv. chim. Acta 16, 1049 (1933)

108) STOLL, A., KREIS, W.: Helv. chim. Acta 18, 120 (1935)

aus der Perlonsäure C-F herauswaschen läßt. Ist aber eine Kristallisation der Cardenolide (Mischkristallisiert III) eingetreten, d.h. sind sie von R und V, Säuren und Gerbstoffen restlos befreit, so ist es praktisch unmöglich, sie wieder in Wasser zu lösen¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾.

Aus dem Gesagten folgt, daß bei Anwesenheit bestimmter Ballaststoffe die Wasserlöslichkeit der Convallaria-Cardenolide stark erhöht ist. Wir untersuchten daraufhin verschiedene Arzneispezialitäten und fanden kein Präparat, das eine Zubereitung eines Reincardenolids darstellt oder auf resorptionsfördernde Zusätze verzichtet.

b) Möglichkeit der additiven Wirkung der Begleitstoffe

In letzter Zeit wurde festgestellt¹¹¹⁾⁻¹¹⁶⁾, daß phenolische Stoffe, die in der Lage sind, bei Gegenwart von Sauerstoff zu polymerisieren, als Sauerstoff-Akzeptoren fungieren können und damit andere Substanzen - etwa das Adrenalin - schützen. Das bedeutet einerseits, daß das im Blut vorhandene Adrenalin langsamer abgebaut wird, wodurch gleichzeitig eine Gefäßabdichtung bzw. Gefäßverengung zustandekommt. Auf diese Weise könnte man sich beispielsweise auch die langsamere Ausscheidung eines Cardenolids erklären.

109) vgl. hierzu: ERBRING, H., KOCH, Fr. E., LORENZ, D., MADDAUS, R., ORZECOWSKI, G. u. PATT, P.: Medizinische 35, 1326 (1958)

110) KOENIG, H.-B.: Dissertation, Hamburg 1950

111) FUHRMANN, F. A.: Amer. J. Physiol. 181, 123 (1955)

112) SCHREIBER, M. u. ELVEHJEM, C. A.: J. Nutrit. 54, 257 (1954)

113) SALVÉ, J. A., NEUMANN, J. u. LAVOLLAY, J.: C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 227, 1170 (1948)

114) PARROT, J. L. u. LAVOLLAY, J.: C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 218, 211 (1944)

115) PARROT, J. L., LAVOLLAY, J. u. GALMICHE, P.: C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 138, 330 (1944)

116) GRISMON, J. M., BEREZ, R. R., MADDEN, J. D. u. FUHRMANN, F. A.: Amer. J. Physiol. 164, 391 (1951)

Andererseits wäre denkbar, daß die Flavone bzw. Säuren den für den Hydroxylierungs- bzw. Abbauvorgang notwendigen Sauerstoff abfangen, so daß das Cardenolid länger im Organismus verbleibt, ehe es ausgeschieden wird. So gelang R.REPKE¹¹⁷⁾ bei Versuchen an Ratten der Nachweis, daß Digitoxin erst nach der Hydroxylierung am Kohlenstoff 12 einer schrittweisen, fermentativen Hydrolyse unterliegen kann.

Bei pharmakologischen Untersuchungen, die in den wissenschaftlichen Abteilungen der Firma Dr. MADAUS & Co., Köln, durchgeführt wurden¹¹⁸⁾, hatte ein begleitstoffhaltiges Glykosidkonzentrat gegenüber reinem Convallatoxin den Vorzug eines verzögerten Wirkungseintritts und einer verlängerten Wirkungsdauer.

P. EGGERS und E. ZYLMANN¹¹⁹⁾ heben bei einer pharmakologischen Prüfung des begleitstoffhaltigen Glykosidkonzentrates neben der ausgezeichneten Convallaria-Herz-, vor allem die Diurese-Wirkung hervor.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Flavon-, Säure- und Gerbstoffgehalt in herzwirksamen Drogen¹²⁰⁾¹²¹⁾ nicht unwesentlich zu einer additiven Wirkung beitragen dürften.

c) Möglichkeit einer exakten Bestimmung von Herzglykosiden

Der von uns vorgeschlagene Arbeitsgang zur Isolierung einzelner Convallaria-Inhaltsstoffe hat darüberhinaus analytisch-chemische Bedeutung, da er die Möglichkeit für eine e x a k t e Gehaltsbestimmung aus einer fraktionierten Lösung von Convallaria-

117) REPKE, R.: Naturwissenschaften 46, 173 (1959)

118) ERBRING, H., KOCH, Fr. E., LORENZ, D., MADAUS, R., ORZECOWSKI, G. u. PATT, P.: Medizinische 35, 1326 (1958)

119) EGGERS, P. u. ZYLMANN, E.: Medizinische 35, 1331 (1958)

120) SEEL, H.: Pharmazie 14, 52 (1959)

121) DHINGRA, H. S.: Dissertation, München 1958: Literaturzusammenstellung der Einleitung

Cardenoliden eröffnet.

Bisher wurden solche Bestimmungen nur mit Mischungen vorgenommen (vgl. H. SCHINDLER¹²²), die nach unseren Arbeiten aber neben herzwirksamen Glykosiden noch Flavone und andere Stoffe enthielten. Wir prüften daher, inwieweit solche Begleitstoffe die photometrische Bestimmung stören. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ (Küvettschichtdicke = 1 cm) die Eichkurven von Convallatoxin und dem Mischkristallinat III aufgestellt. Die Verwendung des Spektralphotometers an Stelle des von H. SCHINDLER¹²²) benutzten Leitz-Kompensationsphotometers erfolgte aus Gründen der größeren Genauigkeit. Wir bezeichneten mit: A die Convallatoxin-Stammlösung (22,6 mg/100 ml Methanol p.a.), mit B die Mischkristallinat-Stammlösung (23,0 mg/100 ml Methanol p.a.) und benutzten als Blindlösung für A und B 2 ml n-Kalilauge + 2 ml 2%ige methanolische 3,5-Dinitrobenzoesäurelösung + 4 ml Methanol p.a. Den Lösungen A und B wurden jeweils 4 ml KEDDES Reagens entsprechend den Angaben von H. SCHINDLER¹²²) und der Firma Dr. MADAUS¹²³) zugesetzt, so daß die in Tabelle zusammengestellten Meßlösungen zur Auswertung kamen:

T a b e l l e 6

Lösung A	Methanol p.a.	Extinktion	Cardenolidmenge
0,5 ml	3,5 ml	0,09	113 μg
1,0 ml	3,0 ml	0,18	226 μg
1,5 ml	2,5 ml	0,26	339 μg
2,0 ml	2,0 ml	0,365	452 μg
2,5 ml	1,5 ml	0,448	565 μg
3,0 ml	1,0 ml	0,55	678 μg
3,5 ml	0,5 ml	0,63	791 μg
4,0 ml	-	0,725	904 μg

122) SCHINDLER, H.: Planta med. 6, 140 (1958)

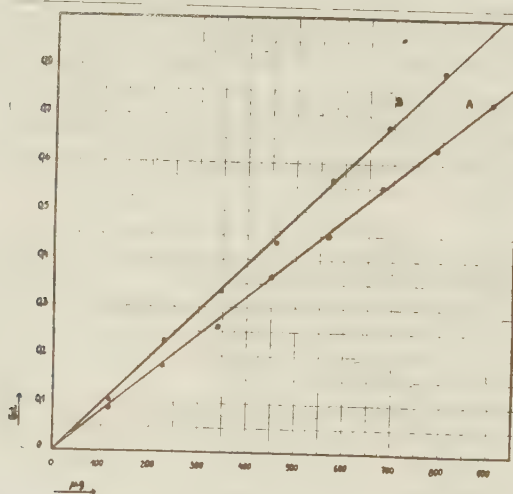
123) Fa. Dr. MADAUS: "Quantitative Bestimmung der Glykoside der Convallaria maj. in CONVACARD-Dragees", private Mitteilung, Oktober 1958

Fortsetzung:

T a b e l l e 6

Lösung B	Methanol p.a.	Extinktion	Cardenolidmenge
0,5 ml	3,5 ml	0,105	115 µg
1,0 ml	3,0 ml	0,230	230 µg
1,5 ml	2,5 ml	0,335	345 µg
2,0 ml	2,0 ml	0,435	460 µg
2,5 ml	1,5 ml	0,565	575 µg
3,0 ml	1,0 ml	0,675	690 µg
3,5 ml	0,5 ml	0,785	805 µg
4,0 ml	-	0,900	920 µg

Die Meßwerte wurden nach genau 5 Minuten abgelesen:



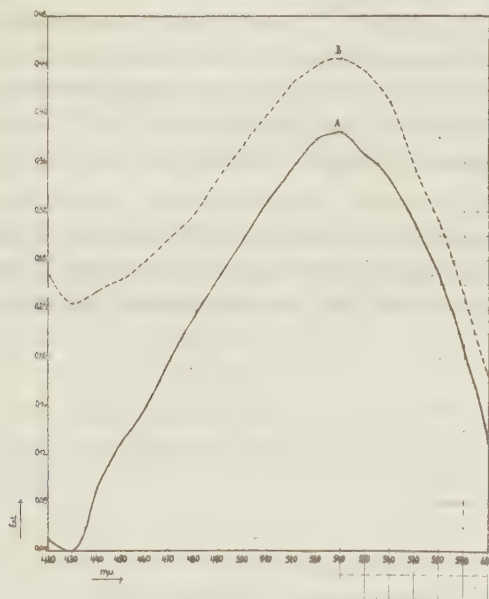
Eichkurven

A = Convallatoxin-Lösung

B = Mischkristalliat-Lösung

Aus den Eichkurven ergibt sich: Eine *e x a k t e* quantitative photometrische Bestimmung von Convallaria-Cardenoliden mit KEDDES Reagens im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ kann nur mit einem Reinglykosid erreicht werden. Eine *a n n ä h e r n d e* Bestimmung des Gesamt-Cardenolid-Komplexes (bezogen auf Convallatoxin) mag in vielen praktischen Fällen ausreichend sein. Unerläßliche Voraussetzung hierfür ist aber die *q u a n t i t a t i v e* Entfernung aller Flavone. Eine photometrische Auswertung einer flavonhaltigen Cardenolidprobe würde einen wesentlich höheren Gehalt an herzwirksamen Glykosiden vortäuschen.

Zur Bestätigung nahmen wir zwei UV-Spektren auf. Die Zusammensetzung ihrer Meß- und Blindlösungen veranschaulicht Tabelle 7 (siehe S. 36).



Konz.: A = 452 μg Convallatoxin }
 B = 452 μg Convallatoxin } in KEDDES Reagens
 + 62 μg Rutin

UV-Spektren

T a b e l l e 7

Lösung	Convallatoxin-Lösung	2%ige meth. 3,5-Dinitrobenzoesäure-Lösung	n-Kalilauge	Methanol p. a.	Rutin-Lösung
Meßlösung A	1 ml = 452 µg	2 ml	2 ml	3 ml	-
Meßlösung B	1 ml = 452 µg	2 ml	2 ml	2,5 ml	0,5 ml = 62 µg
Blindlösung	-	2 ml	2 ml	4 ml	-

Schon ein Rutinzusatz von 62 µg auf 452 µg Convallatoxin bewirkte somit in dem Wellenbereich von $\lambda = 420 \text{ m}\mu$ bis $\lambda = 600 \text{ m}\mu$ eine erhebliche Abweichung (bei $\lambda_{\text{max.}} = 540 \text{ m}\mu$: + 18,6%) von der Convallatoxin-Extinktion. Nach den Berechnungen von R. COBET¹²⁴⁾ und R. LAUFKE¹²⁵⁾ steht aber die native Zusammensetzung von Flavon zu Cardenolid in der Droge im Verhältnis 50 mg% zu 200 mg%, wodurch die Fehlerspanne noch wesentlich vergrößert wird. Auf Grund dieser Ergebnisse halten wir die von H. SCHINDLER¹²⁶⁾ angegebene chemische Wertbestimmung für ungeeignet.

Eine quantitative, photometrische Bestimmung eines reinen Cardenolid-Mischkristallisates führt somit zu Ergebnissen, die in vielen praktischen Fällen ausreichend sein mögen, e x a k t e Werte ergeben sich nur bei der Auswertung eines Reincardenolids.

124) COBET, R.: Dissertation, München 1957

125) LAUFKE, R.: Pharmazie 12, 745 (1957)

126) SCHINDLER, H.: Planta med. 6, 140 (1958)

III. Experimenteller Teil

A. Papierchromatographie

Bei der papierchromatographischen Untersuchung der Con-vallaria-Inhaltsstoffe wurde die absteigende Methode in einer großen Chromatographierkammer der Firma Bender & Hobein, München, und die aufsteigende Methode in einer 25 cm hohen und 12 cm weiten Glasglocke ausgeführt. Für alle Chromatogramme benutzten wir Schleicher & Schüll-Papier 2043 b.

a) Aufsteigende Papierchromatographie

Die Cardenolide und die Substanzen R und V trugen wir auf 20 x 24,5 cm große Chromatogramme (mit 2 seitlichen Schließen) in 2 cm Abstand auf, besprühten mit essigestergesättigtem Wasser und entwickelten die feuchten Chromatogramme mit wassergesättigtem Essigester. Die Sichtbarmachung der Cardenolide erfolgte mit KEDDES Reagens¹²⁷⁾¹²⁸⁾ im Tageslicht; die Substanzen R und V wurden mit basischem Bleiazetat im UV-Licht dargestellt.

b) Absteigende Papierchromatographie

Flavonglykoside, Flavonaglykone, Säuren und Zucker trugen wir in 2,5 cm Abstand voneinander auf 60 x 60 cm große Chromatogrammbögen auf und verwendeten als Fließmittel die folgenden Systeme bzw. ihre Oberphasen:

1. Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) = AAW
für die Chromatographie der Flavonglykoside, Flavonaglykone und Säuren,
2. Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) = BEW
für die vergleichende Papierchromatographie der Flavonglykoside,

127) KEDDE, D. L.: Dissertation, Leiden 1946

128) BUSH, J. E. u. TAYLOR, D. A. H.: Biochem. J. 52, 643 (1952)

zogen hatte, destillierten wir im Vakuum ab und suspendierten den Rückstand derart mit Wasser, daß 20 ml etwa 4 g Festsubstanz enthielten.

c) Perlonsäule C-F

In eine Glassäule von 4 cm Durchmesser wurden 75 g Perlonpulver der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik Nr. K 228 MB 2 mit Aqua dest. bis zu einer Höhe von 35 cm eingeschlämmt.

20 ml des suspendierten Essigester-Äthanol-Rückstandes trugen wir mit Hilfe einer Pipette gleichmäßig auf diese Säule auf und eluierten mit destilliertem Wasser. Bald nach dem Start zeigte die Säule im UV-Licht folgende Gliederung: Einer breiten blauen Front folgte langsam ein schmales Flavonband, während am Start ein breiter brauner Substanzring, restliches Chlorophyll und Gerbstoff verblieben. Nachdem mit etwa 800 ml Aqua dest. alle wasserlöslichen Stoffe eluiert worden waren (Prüfung mit KEDDES Reagens), wurde mit ca. 400 ml Methanol das adsorbierte Flavon vom Polyamid gelöst.

Durch Fraktionierung der Säulendurchläufe ergab sich folgende Auftrennung:

1. wässriger Vorlauf (100 ml) : 5 Cardenolide ohne Säuren und ohne Flavone,
2. wässrige Hauptfraktion (350 ml) : 9 Cardenolide, Säuren und keine Flavone,
3. wässriger Nachlauf (150 ml) : 9 Cardenolide, Säuren und keine Flavone,
4. wässrig-methanolisches Eluat (50 ml) : Hauptcardenolid D, Flavon KI und Säuren = Lösung IV,
5. methanolische Hauptfraktion (200 ml) : Flavone R und IK, keine Cardenolide und Säuren,
6. methanolischer Nachlauf (150 ml) : Flavone R und IK, keine Cardenolide und Säuren.

Nach dem Vergleich der beiden Chromatogramme von diesen 6 Säulenfraktionen (eines aufsteigend zur Prüfung auf Cardenolide, eines absteigend auf Flavone), wurden die flavonfreien Eluate 1-3 als Lösung I und die cardenolidfreien 5-6 als Lösung II vereinigt und im Vakuum eingengt.

d) Cardenolid-Mischkristallisat

Die Lösung I der Perlonsäule C-F schied nach wenigen Tagen (meist schon beim Einengen im Vakuum) bei Zimmertemperatur ein rein weißes Mischkristallisat III ab. Die Chromatographie ergab, daß die Cardenolide A, B, C, D, E, F und I zum großen Teil auskristallisiert waren, während ihr restlicher Anteil, Säuren, die Substanzen R und V sowie die wenig konzentrierten Cardenolide G und H quantitativ in der Mutterlauge verblieben.

e) CRAIG-Verteilung

Zur Auftrennung des Mischkristallisates III bereiteten wir eine multiplikative Verteilung vor: In Vorversuchen prüften wir verschiedene Lösungsmittelkombinationen durch Probeverteilungen über 30 Stufen. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten brachte in diesem Falle wenig Anhaltspunkte, da sich das aufzutrennende Gemisch aus 7 Komponenten zusammensetzte.

Als aussichtsreich erwies sich schließlich die Kombination:

8 VT Essigester, 1,5 VT iso-Amylalkohol,
1,5 VT Äthanol, 8,5 VT Wasser und
0,5 VT Trichloräthylen.

Die Lösungsmittel wurden zusammengegeben, die Phasen durch 1stündiges Schütteln (in Anteilen zu 4 l) bei Zimmertemperatur gegeneinander abgesättigt, filtriert, getrennt und die Unterphase in eine 200stufige, vollautomatische Verteilungsbatterie nach F. A. v. Metzsch eingefüllt (Kapazität eines Elementes = 100 ml). Um eventuelle Phasenverschiebungen zu vermeiden, ließen wir der Verteilung 10 Leerstufen vorauslaufen, ehe 1,5 g des Mischkristalli-

sates III (bei gelinder Wärmezufuhr in Ober- und Unterphase des O. Elementes gelöst) in die CRAIG-Batterie eingefüllt wurden. Nach ungefähr 18 Stunden (= 2 Arbeitstage) waren 120 Verteilungsschritte erreicht. Eine verzögernde Emulsionsbildung trat nicht ein. Zur Phasentrennung genügten 4 Minuten Ruhezeit.

Der iso-Amylalkohol-Gehalt des Lösungsmittels verursachte während der Verteilung die Bildung eines Filmes an den Wänden der Glaselemente. Beim Kippvorgang trat jedoch wieder eine exakte Trennung in Ober- und Unterphase ein. Da aber die Substanzwanderung in dem vorgeschlagenen Lösungsmittelsystem befriedigte, wurde der iso-Amylalkohol nicht durch einen ähnlichen Alkohol ersetzt.

Nach beendeter Verteilung wurden die Ober- und Unterphasen von je 2 Elementen (= 200 ml) zusammengefaßt und die 60 Fraktionen im Vakuumtrockenschrank bei 45° C und 20 torr über reichlich Calciumchlorid bis fast zur Trockene eingeengt (Dauer: 48-60 Stunden bei wiederholter Erneuerung des Calc.chlor. sicc.). Die aufsteigende Papierchromatographie der konzentrierten Lösungen, die zum Teil schon charakteristische Kristalle abgeschieden hatten, gab folgende Übersicht über die Substanzwanderung:

1. - 14. Element	: leer		
15. - 18. "	: A + B	69. - 72. Element	: E
19. - 26. "	: B + C	73. - 78. "	: E + F
27. - 30. "	: C	79. - 92. "	: F
31. - 40. "	: C + D	93. - 96. "	: F + I
41. - 60. "	: D	97. - 110. "	: I
61. - 68. "	: D + E	111. - 120. "	: leer

Vor dieser 120stufigen Verteilung prüften wir das Ergebnis bei 100 Verteilungsschritten:

1. - 12.	Element:	leer		
13. - 16.	"	: A + B	53. - 62.	Element: D + E
17. - 22.	"	: B + C	63. - 68.	" : E + F
23. - 28.	"	: C	69. - 82.	" : F
29. - 34.	"	: D + C	83. - 84.	" : F + I
35. - 52.	"	: D	85. - 100.	" : I

Im Verhältnis hatte sich das Substanzgemisch analog gegliedert, allerdings war Cardenolid E bei der 100stufigen Verteilung noch nicht greifbar.

Von den 7 Cardenoliden des Mischkristallisates III konnten durch eine multiplikative Verteilung über 120 Stufen die Cardenolide C, D, E, F und I rein gewonnen werden. Wir sind der Ansicht, daß auch die wenig konzentrierten Glykoside A und B - und G und H, falls sie auskristallisieren - bei einer weiteren Erhöhung der Stufenanzahl erreichbar sind.

Von den Reinglykosiden wurde D durch vergleichende Papierchromatographie und Mischschmelzpunkt ($\approx 241-242^{\circ}\text{C}$, korr.) mit der Testsubstanz der Firma Roth, Stuttgart, als Convallatoxin charakterisiert. Cardenolid D war mit etwa 50%, F mit ca. 20% am Mischkristallisat beteiligt, während die Konzentration von C über B > E > I > A abnahm. Da Glykosid E in seinen physikalischen Eigenschaften zwischen den beiden Hauptcardenoliden liegt, war eine Gewinnung verhältnismäßig schwierig.

C. Versuche zur Isolierung der Begleitstoffe

a) Isolierung der Flavone

Wie aus einem absteigenden, mit basischem Bleiazetat besprühten AAW^{*)}-Chromatogramm hervorging, enthielt Lösung II der Perlonsäule C-F (vgl. S. 40) das im UV-Licht goldgelbe Flavon IK (R_F -Wert = 0,37 - 0,38) als Hauptbestandteil. Der Gehalt an orangefarbenem, zum Teil verdecktem Flavon R (R_F -Wert = 0,36) und an verschiedenen Säuren (R_F -Wert = 0,6 - 0,9) war gering.

Lösung II wurde derart in eine wässrige Suspension überführt, daß in 15 ml etwa 1 g Festsubstanz angeschlämmt war. Entsprechend der Polyamidsäule C-F (siehe S. 39) bereiteten wir aus 75 g DURETHAN der Firma Bayer, Leverkusen, eine Perlonsäule F von 4 cm Durchmesser und 35 cm Höhe, auf die wir die 15 ml Flavon-Säure-Suspension sorgsam auftrugen und mit 30%igem Isopropanol (etwa 500 ml) eluierten.

Im UV-Licht betrachtet, folgte einer stark blau fluoreszierenden Front ein kräftiges, dunkles Flavonband, dem sich eine zweite schmale, dunkle Zone anschloß. Wir unterteilten die Säulendurchläufe in folgende Fraktionen^{**) :}

<u>Fraktion</u>	<u>Menge</u>	<u>Farbe im UV-Licht</u>
1. Vorlauf	100 ml	stark blau fluoresz.
2. - 11. Flavonhauptfraktionen	10 x 20 ml	dunkel
12. - 14. Nachlauf	3 x 20 ml	dunkel

*) Lösungsmittelsystem: Essigester-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

**) Diese Angaben beziehen sich auf eine Chromatographie an dem Polyamid DURETHAN der Firma Bayer, Leverkusen. Bei Verwendung des entsprechenden Präparates der BASF, Ludwigshafen, liegen andere Adsorptionsverhältnisse vor.

Die absteigende Papierchromatographie dieser (zum Teil im Vakuum eingeeengten) Eluate gab folgende Übersicht:

Fraktion	1 : flavonfreie Säuren (= Lösung V)
"	2 : Flavon IK mit wenig Säure
"	3 - 11 : Flavon IK
"	12 : Flavone IK und R
"	13 - 14 : Flavon R und wenig Flavon IK.

Während die Mischfraktionen 2 und 12 zur Wiederholung dieser Säulenchromatographie in Ausgangslösung II zurückgegeben wurden, vereinigten wir die Fraktionen 3 - 11 (Flavon IK) und entzogen den Fraktionen 13 - 14 auf einer neuen, 15 cm hohen, 4 cm weiten DURETHAN-Säule selektiv das Flavon IK mit 30%igem Isopropanol, so daß eine chromatographisch einheitliche Lösung von Flavon R resultierte.

b) Identifizierung der Flavone

1) Hauptflavon IK

Die konzentrierten Fraktionen 3 - 11 der Polyamidsäule F schieden in wässrig-methanolischer Lösung weder bei Zimmertemperatur noch im Kühlschrank Kristalle ab. Da bei normalen Laufzeiten in den Lösungsmittelsystemen AAW, BEW und IAW (siehe S. 37-38) keine sichtbaren Begleitstoffe nachgewiesen werden konnten, hydrolysierten wir mit 2%iger Salzsäure 1 Stunde lang. Durch vergleichende Papierchromatographie in den Systemen IAW und BEW ließen sich *I s o r h a m n e t i n* und *K ä m p f e r o l* (etwa im Verhältnis 3 : 1) nachweisen.

Die neutralisierte und eingeengte Hydrolysenflüssigkeit enthielt reichlich *R h a m n o s e*, *G a l a k t o s e* und wenig *G l u c o s e*.

Auf einem mit basischem Bleiazetat besprühten Durchlaufchromatogramm (44 Stunden in BEW) konnte gezeigt werden, daß

zwei sehr ähnliche Flavonglykoside vorlagen, die bei normalen Laufzeiten den gleichen R_f -Wert besaßen. Auf dem Durchlaufchromatogramm wanderten die Substanzen bis an die Front, wobei sich aus dem kräftigen goldgelben Isorhamnetin-Glykosidfleck eine schwache grüngelbe Kämpferol-Glykosidspitze herausschob.

Der einzige entscheidende konstitutionelle Unterschied dieser beiden Glykoside dürfte die Methoxy-Gruppe in 4'-Stellung des Isorhamnetins sein.

Eine präparative Trennung der Flavone IK versuchten wir mit Hilfe der multiplikativen Verteilung nach CRAIG. Als Lösungsmittelsystem verwendeten wir 8,5 VT Essigester, 1 VT iso-Amylalkohol, 0,5 VT Trichloräthylen und 10 VT Wasser, das einen Verteilungskoeffizienten für Rutin von 0,77, für Kämpferol-3-rhamnoglucosid von 1,5 und für Flavon IK von 1,1 aufwies.

Die Vorbereitung und Durchführung der Verteilung von 1 g Festsubstanz der Flavone IK über 192 Stufen erfolgte analog der des Cardenolid-Mischkristallisates III (siehe S. 40). Das Ergebnis läßt sich wie folgt zusammenfassen:

Fraktion 1 - 25 : braune, nicht näher zu definierende
Ballaststoffe,
26 - 47 : leer,
48 - 85 : Flavone I und K gemeinsam (bewiesen durch
Hydrolysen und Durchlaufchromatogramme),
86 - 192 : leer.

Einen weiteren Trennungsversuch unternahmen wir mit den resultierenden 38 Flavonfraktionen, die nach Einengung einer zweiten Verteilung über 301 Stufen mit dem gleichen Lösungsmittelsystem zugeführt wurden. Hierbei verblieben in den ersten 4 Elementen nochmals geringe Mengen von Ballaststoffen, die wir entnahmen, ehe die 200stufige, vollautomatische Verteilungsapparatur zum Rundlauf geschlossen wurde.

Die Überprüfung der einzelnen Fraktionen ergab:

1. - 4. Element: nochmals wenig Ballaststoffe,
5. - 74. " : leer
75. - 135. " : Flavone I und K gemeinsam (bewiesen durch
Hydrolysen und Durchlaufchromatogramme),
136. - 301. " : leer.

Aus den konzentrierten Flavonfraktionen der zweiten Verteilung schied sich nach einiger Zeit ein Kristallbüschel aus. Auf Grund des Schmelzpunktes (= 176 - 177° C, korrr.), des UV-Spektrums ($\lambda_{\text{max.}}$ = 255 m μ und 355 - 357 m μ) und des R_f -Wertes (= 0,38, AAW) vermuteten wir, daß das Hauptflavonglykosid der *Convallaria majalis* Isorhamnetin-3-rhamnoglucosid ist.

Um noch einen Anhaltspunkt für die Zuckerzugehörigkeit zu gewinnen, die auch das Kämpferolglykosid charakterisieren würde, versuchten wir auf einem BEW-Durchlaufchromatogramm eine Enzymhydrolyse¹³⁰⁾ mit dem Hydrolasengemisch HYDG der Firma C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim: In der zweiten Dimension ließen sich auf dem Chromatogramm jedoch keine Zucker nachweisen. Das Hydrolasengemisch hatte die Flavonglykoside also nicht angegriffen.

2) Flavon R

Die wässrig-alkoholische Lösung des Flavons R schied keinen kristallinen Anteil ab. Durch vergleichende Papierchromatographie des Glykosides mit Rutin (vgl. Tab. 2, S. 21) und durch die der Hydrolysenprodukte mit Quercetin bzw. Rhamnose und Glucose (vgl. Tab. 3, S. 22) ließ sich die Identität von Flavon R mit R u t i n beweisen.

3) Flavon KI

Das Papierchromatogramm der Lösung IV der Perlonsäule C-F (vgl. S. 39) zeigte Flavon KI, Säuren und das Hauptcardenolid D.

130) BLISS, C. A.: J. Amer. pharmac. Assoc. 42, 348 (1953)

Zur Entfernung der Säuren schüttelten wir die 10 ml wässriger Phase mit etwa 150 ml Äther aus, dunsteten das organische Lösungsmittel ab und fügten den Ätherrückstand VI zu Lösung V der Perlonsäule F. Anschließend wurde der wässrigen Phase mit ca. 150 ml Chloroform das Cardenolid D entzogen (Chloroformrückstand zu Lösung I der Perlonsäule C-F).

Da sich auch aus der gereinigten Flavonlösung KI keine Kristalle gewinnen ließen, hydrolysierten wir mit 2%iger Salzsäure 1 Stunde. Durch den papierchromatographischen Vergleich mit Testsubstanzen wurden als Hydrolysenprodukte I s o - r h a m n e t i n und K ä m p f e r o l sowie R h a m n o - s e , G a l a c t o s e und G l u c o s e nachgewiesen. Auf Grund der geringen Konzentrationen, in der die Flavone KI zur Verfügung standen, und der Ergebnisse bei den Trennungsvorversuchen von den Flavonen IK sahen wir von einer Weiteruntersuchung von KI ab.

c) Versuche zur Identifizierung organischer Säuren

Als reine Säurefraktionen gewannen wir Lösung V der Perlonsäule F (siehe S. 44) und den Ätherrückstand VI der Lösung IV (siehe S. 46). Säurehaltig war aber auch die Lösung I, die nicht mehr kristallisierende Mutterlauge des Mischkristallisates III. Aus ihr fielen mit etwa 50 ml Liquor Plumb. sub. DAB 6 Säuren, die Substanzen R und V und eventuell noch Gerbstoffe aus.

Das Cardenolid-haltige, mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat schied nach einigen Tagen weitere herzwirksame Glykoside ab.

Die gewaschene Bleifällung wurde in ca. 30 ml Aqua dest. suspendiert, mit H_2S zersetzt, das Bleisulfid abfiltriert und im Filtrat der Schwefelwasserstoff durch gelindes Erwärmen

Die so erhaltene Lösung der Säuren und der Substanzen R und V trugen wir auf eine 15 cm hohe, 3 cm weite Perlonsäule S auf, eluierten mit destilliertem Wasser (etwa 200 ml) und anschließend mit 200 ml Methanol. Tabelle 8 faßt die Fraktionierung und das papierchromatographische Ergebnis zusammen:

T a b e l l e 8

Fraktion	Menge	Tageslicht	UV-Licht	Chromatogramm unbespr. mit bas. Bleiazet.	
1. wäbrig	50 ml	braun	blau	-	-
2. wäbrig	80 ml	dunkelbr.	blau	-	-
3. wäbrig	20 ml	hellrosa	-	-	R u. V
4. wäbrig	20 ml	hellrosa	-	-	R u. V
5. methan.	180 ml	gelbbraun	blau	blau	K u. F
					Lösg. VII
					Lösg. VIII

Das angesagte, als Lösung VIII bezeichnete, methanolische Säuleneluat wurde mit Lösung V und dem Ätherrückstand VI vereinigt und einer vergleichenden Papierchromatographie (vgl. Tab. 4, S.26) unterzogen. Auf Grund der Übereinstimmung der R_F -Werte im System AAW und 15%iger Essigsäure und der Farbreaktionen mit Ammoniak und basischem Bleiazetat im IV-Licht mit denen der entsprechenden Testsubstanzen ergänzen wir Chlorogen-, Kaffee- und Ferulasäure zu den bisher in der Literatur angeführten Convallaria-Inhaltsstoffen.

d) Versuche zur Charakterisierung der Substanzen R und V

Die Lösung VII (siehe oben, Tab. 8) zeigte im UV-Licht auf einem W/E-Chromatogramm, mit basischem Bleiazetat besprüht, einen rostroten (R_F -Wert = 0,48) und einen violetten (R_F -Wert = 0,64) Substanzfleck.

Wir vereinigten die Fraktionen 3 und 4 der Perlonsäule S und konzentrierten im Vakuum auf ca. 5 ml wässrige Lösung. Hierbei schied sich etwas gelöstes Perlon aus, das wir abzentrifugier-

ten. Der abdekantierten Flüssigkeit entzogen wir mit etwa 100 ml Äther (in Anteilen zu 15 - 20 ml) die Substanzen R und V, die nach dem Verdunsten des Äthers als farblos-öliger Rückstand verblieben.

Mit ihm wurden zunächst - jeweils 1 Stunde lang - saure Hydrolysen in 2%iger Salzsäure, 2%iger Schwefelsäure, 5%iger Schwefelsäure und 10%iger Schwefelsäure vorgenommen, durch welche die Substanzen R und V nicht verändert wurden (papierchromatographischer Nachweis). Ferner führten wir - je 1 Stunde lang - alkalische Hydrolysen in 5%iger Kalilauge und 1%iger Kalilauge durch. Die wässerig-alkalischen Hydrolysenflüssigkeiten wurden ausgeäthert und chromatographiert. Auf dem W/E-Chromatogramm konnten nach Besprühen mit basischen Bleiazetat im UV-Licht weder in der wässerigen noch in der organischen Phase Hydrolysenprodukte oder unveränderte Substanzen nachgewiesen werden.

Von den geringen Mengen des verbleibenden farblos-öligen Ätherrückstandes nahmen wir in wässriger Lösung ein UV-Spektrum auf (siehe S. 27). Das Gemisch der Substanzen R und V zeigte bei $\lambda = 212,5 \text{ m}\mu$ und $\lambda = 285 \text{ m}\mu$ ein Maximum. Bei Zugabe von Natriumazetat oder n-Natronlauge wurde besonders das erste Maximum stark erhöht.

Durch Farbreaktionen auf dem Papierchromatogramm legten wir schließlich noch einige Charakteristika der beiden Stoffe fest:

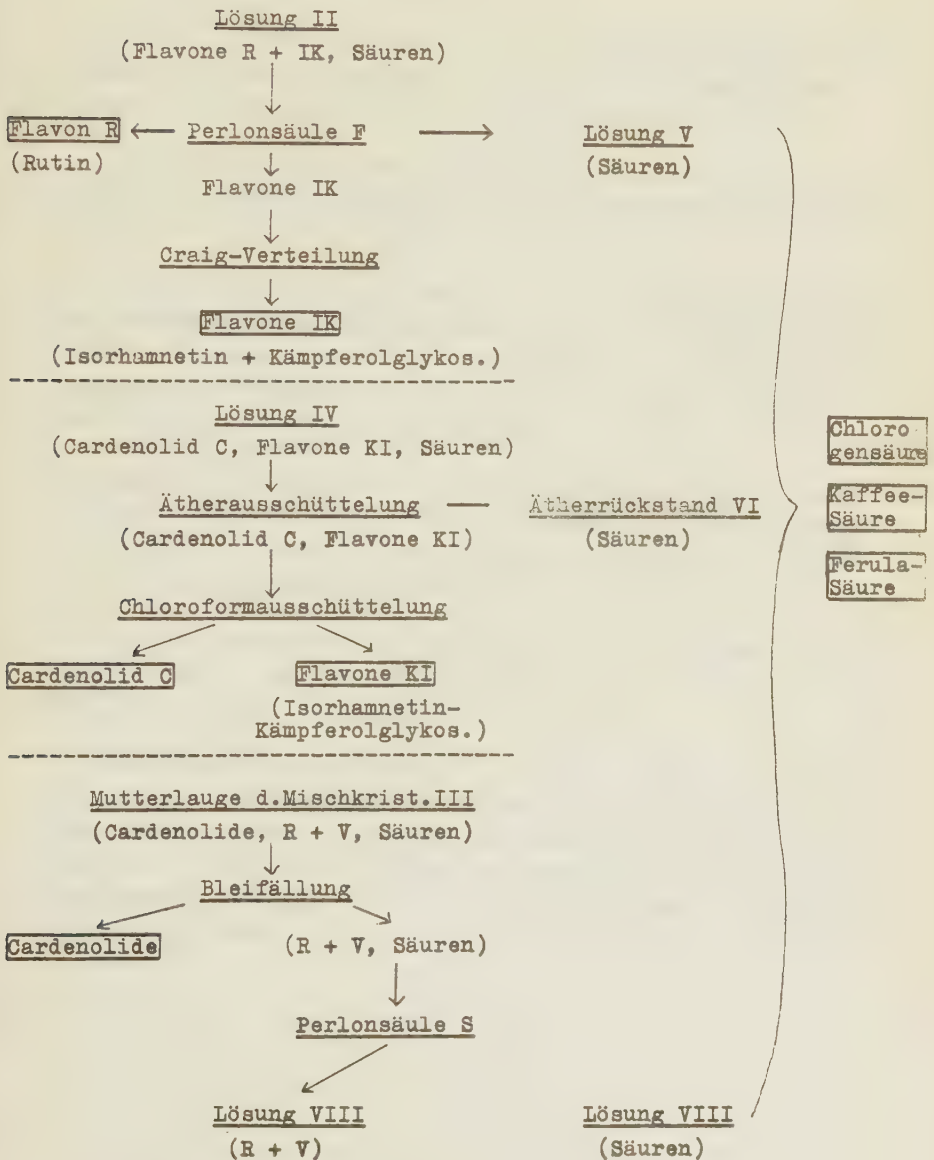
Sprühreagens	Reaktion bei den Substanzen	
	R	V
bas.Bleiazetat	rostrot	fahlviolett
KEDDEs Reagens	-	-
Eisen-III-chlorid	-	-
TOLLENS Reagens	schwach grau	schwach grau

Nach dem Vergleich der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Substanzen R und V dürfte es sich bei ihnen um sehr alkaliempfindliche Stoffe mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Komponente im Molekül handeln. Wir vermuten, insbesondere auf Grund des UV-Spektrums und der Reaktion mit TOLLENS-Reagens, die Zugehörigkeit zu einer G e r b s t o f f - k l a s s e , möglicherweise handelt es sich um ein Chebulsäure-Derivat.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Auftrennung der Convallaria-Begleitstoffe gibt die schematische Darstellung auf Seite 51.

Der Firma Dr. MADAUS & Co., Köln-Merheim, insbesondere Herrn Dr. med. Rolf Madaus, Herrn Professor Dr. Orzechowski, Leiter der pharmakologischen Abteilung, und Herrn Professor Dr. H. Erbring, Leiter der chemischen Abteilung der Firma Dr. Madams, danken wir sehr herzlich für die Unterstützung und Förderung der vorliegenden Untersuchungen.

Schematische Darstellung der Begleitstoff-Auftrennung



L e b e n s l a u f

Am 20. Oktober 1930 wurde ich, Ilse-Marie Diesener, als Tochter des Fabrikanten Georg Diesener und seiner Ehefrau Thekla, geb. Walsemann, in Wernigerode am Harz geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich im Herbst in das Fürstin-Anna-Lyceum in Wernigerode ein und legte dort im Juli 1949 die Reifeprüfung ab.

Meine berufliche Laufbahn begann ich im Oktober 1949 als Helferinnen-Lehrling in der Rats-Apotheke, Wernigerode. Im April 1950 wechselte ich als Praktikantin in die Westerntor-Apotheke, Wernigerode. Im September 1951 bestand ich das pharmazeutische Vorexamen in Halle/Saale.

Während der folgenden einjährigen Tätigkeit als vorgeprüfte Apothekerassistentin in der Hirsch-Apotheke, Wernigerode, bemühte ich mich ohne Erfolg um eine Studienzulassung in der sowjetischen Besatzungszone.

Im Wintersemester 1952/53 nahm ich an der Universität München das Pharmaziestudium auf, das ich im Herbst 1955 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen abschloß.

Nach meiner Kandidatenzeit - vom 1.1.1956 - 31.12.1956 in der Apotheke zum Schwarzen Adler in Solingen-Ohligs - begann ich im Januar 1957 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, mit den vorliegenden Untersuchungen.

